



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0024921
(43) 공개일자 2020년03월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/32 (2017.01) A61K 47/38 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2013.01)
A61K 47/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7003488
- (22) 출원일자(국제) 2018년07월04일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년02월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/PL2018/000066
- (87) 국제공개번호 WO 2019/009739
국제공개일자 2019년01월10일
- (30) 우선권주장
P.422140 2017년07월06일 폴란드(PL)

- (71) 출원인
이머고팜 에스피. 지 오.오. 에스피.케이.
폴란드 05-510 콘스탄신-제지오나 얼. 조제파 필
수드스키에고 11
- (72) 발명자
췌에췌아라 마리우스
폴란드 05-520 콘스탄신-제지오나 얼. 포고드나 4
튀조제 알투어
폴란드 05-532 토미스 얼. 알렉산드라 프레드리 3
- (74) 대리인
황의만, 황성필

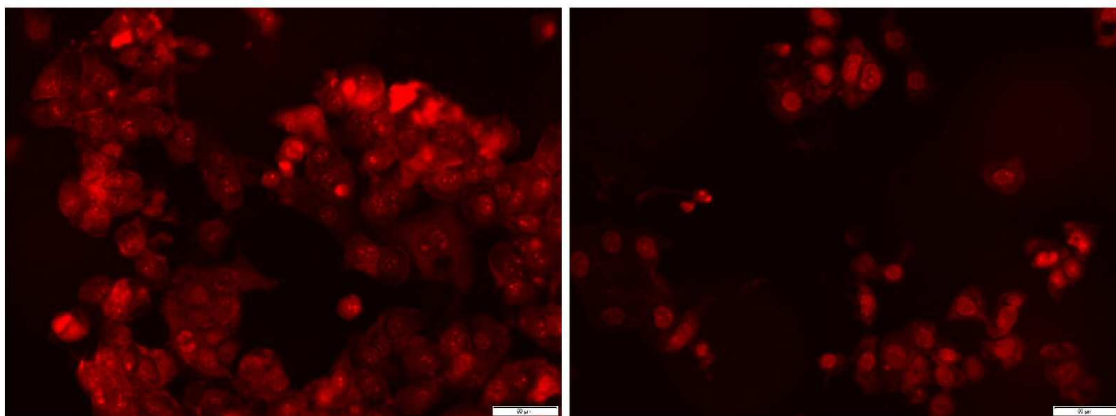
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 토타롤의 용도 및 토타롤을 함유하는 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 세균 기원의 질 점막 염증의 치료, 이러한 치료에서 증상의 완화 및 이러한 염증 재발의 예방 및 방지를 위한 제제를 제조하기 위한 토타롤의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 세균 기원의 질 점막 염증의 치료, 이러한 치료에서 증상의 완화 및 이러한 염증 재발의 예방 및 방지를 위한 약제학적 조성물로서, 75 내지 95 중량부의 셀룰로스 유도체, 0.5 내지 5 중량부의 락트산, 0.5 내지 5 중량부의 염기성 중합체를 함유하고, 여기서 락트산 대 염기성 중합체의 화학량론 비가 1:1 내지 8:1의 범위 내이며, 토타롤을 활성 물질로서 0.001 내지 5 중량부의 양으로 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/32 (2013.01)

A61K 47/38 (2013.01)

A61P 15/02 (2018.01)

A61P 31/04 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

세균 기원의 질 점막 염증의 치료, 이러한 치료에서 증상의 완화 및 이러한 염증 재발의 예방 및 방지를 위한 제제를 제조하기 위한 토타롤의 용도.

청구항 2

제1항에 있어서, 혐기성 세균성 질염(BV) 및 호기성 질염(AV)에 관한 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 3

75 내지 95 중량부의 셀룰로스 유도체, 바람직하게는 메틸셀룰로스, 0.5 내지 5 중량부의 락트산, 0.5 내지 5 중량부의 염기성 중합체, 바람직하게는 아크릴 중합체, 가장 바람직하게는 메타크릴산과 에틸 아크릴레이트의 공중합체, 또는 키토산 또는 폴리비닐피롤리돈 또는 이들의 혼합물을 함유하며, 여기서 락트산 대 염기성 중합체의 화학량론 비가 1:1 내지 8:1의 범위 내인, 세균 기원의 질 점막 염증의 치료, 이러한 치료에서 증상의 완화 및 이러한 염증 재발의 예방 및 방지를 위한 약제학적 조성물로서, 토타롤을 활성 물질로서 0.001 내지 5 중량부의 양으로 포함함을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 질 세균군(bacterial flora)의 조성물에서의 교란을 방지하기 위한 토타롤의 용도 및 토타롤을 활성 성분으로서 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 부인과 및 산과에서 항균, 항진균, 항원생동물 및 혼합 요법 동안 질 환경의 산성 조절제로서 사용된다. 상기 조성물은 약제학적 제제 또는 의료용 제품으로 사용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 여성 산도 내에서 가장 빈번한 염증 병태는 세균성 질염(BV)으로 자연적인 세균성 미생물군(microflora)의 교란이다. 사춘기 여성에서 상기 질병 단위(disease entity)의 발생 빈도는 10-40 %에 이르는 것으로 추정된다. BV의 과정 동안, *락토바실러스(Lactobacillus)* 속의 간균의 풍부성 감소 또는 심지어 전체 집단 붕괴가 발생하여, 엄격하게 혐기성인 세균의 제어되지 않은 증식을 초래한다. *락토바실러스* 속의 간균 유형, 이들의 풍부성, 및 질 상피 세포에 저장되어 이들 세균에 의해 락트산으로 변형되는 글리코겐의 양은 적절한 수준의 질 pH를 조절하고 이를 유지하는 역할을 한다. 질의 반응은 이들 세균에 의해 생성된 유기산의 총량에 따라 좌우되며, 이 중에서 가장 중요한 것은 위에서 언급한 락트산이다. 이들 산 생성을 제어하면 질 pH 값이 4.5 미만으로 되는데, 이는 질 상피에 대한 *락토바실러스* 속 세균의 부착에 필요하며 정성적 및 정량적 측면에서 올바른 미생물군을 유지할 수 있게 한다. 따라서, 올바른 미생물군은 존재하기 위해 pH > 4.5인 환경을 필요로 하는 미생물의 성장을 억제한다. 이로써, 생리학적 미생물군은 세포 표면상의 영양소 및 수용체 부위에 대한 경쟁에 의해서도 병원성 미생물에 의한 감염으로부터 보호하고, 생식관 면역계를 자극하여 다른 미생물과 교차 반응하는 항체를 생성한다.

[0003] BV의 주요 원인인 가장 빈번하게 분리된 병원체는 *가드네렐라 바지날리스(Gardnerella vaginalis)*로서, 또 다른 혐기성 미생물인 *아포토비움 바지내(Atopobium vaginae)* 뿐만 아니라 BV 케이스의 50%에서 발생하는 *모비룬커스(Mobiluncus)* 종 간균과 마찬가지로, 이 병태로 고통받는 모든 여성에서 대부분 발생한다.

[0004] 질 상피에 부착된 다균성 생물막을 형성하기 위해 병원성 세균을 증식시키는 능력은 BV 과정에서의 치료를 방해하는 특히 중요한 특징이다. *가드네렐라 바지날리스*와 *아포토비움 바지내*를 주성분으로 함유하는 생물막 형성 세균의 콜로니는 젖은 표면에 대해, 그리고 서로에 대해 부착하는 능력을 나타낸다. 생물막 매트릭스의 형성은

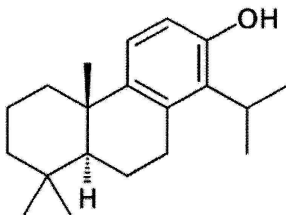
이를 형성하는 미생물을 질 환경의 자연적 요인의 분해 영향 및 항생제를 포함한 약리학적 제제의 영향으로부터 보호하는 것을 목적으로 한다. 치밀한 생물막 구조는 질벽에서 제거하기가 매우 어렵다. *가드넬렐라 바지날리스* 세균이 90 %를 구성하는 상피 세포에 부착된 생물막의 존재가 BV를 겪는 여성의 생검에서 나타났다.

- [0005] 병원체에 의한 생물막 형성 현상, BV의 염증 특징 결여, 61%에 달하는 잘못된 BV 진단 케이스(Amsel 기준에 따른 BV 식별은 저렴하고 용이하며 실제로 모든 부인과 사무실에서 수행하는 것이 가능하지만, 의사의 경험에 따라 평가 주관성 및 낮은 반복성 요인의 단점이 있다), 및 BV가 무증상 특성을 가진 환자 그룹은 12개월 후 대부분의 치료된 환자에서 재발을 초래한다.
- [0006] 세균성 질 감염이 자연 유산, 조기 분만, 자궁 내 감염, 양수 조기 파수, 자궁 내 성장 제한(IUGR), 자궁 점막의 염증 및 비교적 작은 골반의 기관들의 병인 인자 중 하나로 간주되기 때문에 BV 과정에서 발생하는 상술한 특징과 메커니즘은 의학적 관점에서 매우 중요하다. 또한, BV는 감염된 어머니와 신생아에게 동등한 정도로 위협한 다른 주산기 감염의 원인이 될 수 있다.
- [0007] 질 미생물군의 정성적 및 정량적 조성의 교란과 관련된 또 다른 병태는 호기성 질염(AV)이라 불리는 호기성 조건 하에서 존재하는 미생물에 의해 발생하는 질 염증으로 구성된다. AV에서, *락토바실러스* 속 세균의 개수 감소 또는 결여 뿐만 아니라 그람 양성 B군 연쇄상구균(streptococci)의 구균: *스트렙토코커스 아갈락티애* (*Streptococcus agalactiae*), *엔테로코커스 페칼리스*(*Enterococcus faecalis*), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), 및 그람 음성균의 간균: 대장균에 의해 지배되는 조성을 갖는 혼합 질 세균군의 성장이 또한 관찰된다. BV의 경우와 마찬가지로 여기에서도 동일한 변화가 관찰된다. 질 내용물에서 락테이트의 농도가 감소하고, 질 pH 값이 > 6.0으로 증가하며, 또한 전구-염증성 사이토키닌의 농도가 증가한다. 명확한 진단 기준이 없고 진균증 및 트리코모나다증과 같은 다른 감염과 동시 발생하기 때문에, AV 발생 빈도는 정확하게 정의되지 않는다.
- [0008] 질 미생물군의 조성에서 교란의 발생은 생식관 내 염증의 원인이며, 이는 매우 이질적인 산소 조건 하에서 존재하는 완전히 다른 두 종류의 병원성 세균에 의해 야기될 수 있다. 비정상적인 생물군집(biocoenosis) 및 염증은 또한 수술후, 특히 부인과, 산과 및 비뇨기과의 수술후 염증성 합병증의 전개로 이어질 수 있다. 이들은 태아에게도 큰 위협이 되는데, 태아의 유기체는 자궁 내에서 미생물과의 접촉이 없지만 산도를 통과하는 동안 어머니의 질 미생물군에 의해 정착된다.
- [0009] 현재 사용되는 치료 요법의 대부분은 주로 메트로니다졸, 티니다졸 및 BV의 경우 클린다마이신을 기본으로 한다. 이들 물질은 통상 일상적으로 경구 또는 질내 형태로 투여된다. 메트로니다졸의 기본 장점은 호기성 세균과 혐기성 세균 둘 다에 대한 활성과, *락토바실러스* 속의 혐기성 유산균이 상기 항생제에 완전한 내성이 있다는 사실에 있다. 또한, 이 약물은 저렴하고 일반적으로 환자가 쉽게 접근할 수 있으며 내약성이 우수하다. 안타깝게도, 상기 화학요법제의 작용에 대한 *가드넬렐라 바지날리스*의 내성에 대한 보고는 종의 내성 균주의 증가 %도 명시하면서 전세계 과학 문헌에서 점점 더 자주 나타난다. 1993년에 골드슈타인 등(Goldstein et al.)에 의해 수행된 연구는 메트로니다졸 내성 균주 %가 20 % 수준으로 나타났으며 2002년에 동일한 그룹의 연구자들은 내성 균주 %가 29 % 수준으로 증가한 것을 발견하였다. 가장 최근의 보고서에 따르면 메트로니다졸에 대한 내성을 얻는 과정이 상당히 속도로 빨라진다. 2007년에 수행되고 공개된 약물 내성 연구에서, *가드넬렐라 바지날리스* 균주의 메트로니다졸에 대한 내성은 70 %에 도달하는 것으로 관찰되었다. 604명의 여성 그룹으로부터 단리된 67개 균주 수집에 대해 폴란드에서 수행된 연구는 연구된 균주의 68.7 %(67개 중 46개)가 메트로니다졸에 대한 내성을 특징으로 한다는 것을 확인하였다. 메트로니다졸에 대한 설명된 내성 메커니즘을 나타내는 BV-관련 혐기성 균주 수의 놀라운 증가는 수년 내에 세균성 질염에 대한 치료 요법을 변경해야 할 수도 있다.
- [0010] 메트로니다졸과 비교하여, 클린다마이신은 혐기성 그람 음성 간균에 대해 더 높은 효과성을 특징으로 하며, 이와 동시에 호기성 조건하에 존재하는 세균에 대해 제한된 활성을 갖는다. 추가로, 이 약물의 사용으로 인한 부정적인 결과는 *락토바실러스* 속 세균의 성장에 대한 높은 활성과 억제 능력으로 정상적인 질 생태계의 재생 과정을 방해하여 결과적으로 *칸디다 알비칸스*(*Candida albicans*) 및 *칸디다 글라브라타*(*Candida glabrata*) 종의 *사카로마이세테스*(*Saccharomycetes*)에 의해 발생하는 외음부 및 질의 2차 진균 감염을 유도할 수 있다.
- [0011] BV 치료에서 2차 계열 약물로서 클라블론산을 함유한 아목시실린이 제안되어있다. 안타깝게도, 문헌에는 혐기성 세균에 의해 야기된 질 감염의 치료에서 상기 항생제의 효과성 평가에 대한 데이터가 부족하다.
- [0012] 설명된 항생제의 높은 효과성에도 불구하고 세균 기원의 질 및 산도 감염의 재발이 매우 자주 관찰된다. 이 현상은 특히 BV 환자의 경우 분명하다. 여성의 대략 30 %는 치료 완료로부터 3개월 후에, 대략 80 %는 1년 내에

BV의 새로운 임상 증상을 겪을 것으로 추정된다. 사용되는 항생제에 대한 혐기성 세균 균주의 내성과, 이와 동시에, 질 미생물군에서 자연적으로 발생하며 적절한 기능화에 필요한 *락토바실러스* 속의 유산균에 대한 높은 항균 활성은 재발의 주요 원인 중 하나로 지시된다.

- [0013] 중요한 문제는 질 점막 감염의 주요 원인을 구성하는 세균 구조의 변화에 있다. 새로운 내성 메커니즘의 진화를 목적으로 하는, 병원성 미생물에서 발생하는 변화의 범위는 다방향 및 다단계이다. 종종 단일 병원체는 통상적으로 투여되는 광범위한 치료 제제로부터 보호하기 위해 여러 메커니즘을 사용한다.
- [0014] 따라서, 이미 시험된 병원체에 대한 일반적으로 알려진 활성에도 불구하고, 매우 가변적인 구조를 갖는 병원성 미생물에 대해 활성인, 주어진 물질의 항균 활성 범위를 현재 예측하기는 어렵다. 치료 물질의 활성은 시간에 따라 변할 수 있으며, 일부 경우에는 병원체의 새로 진화된 방어 메커니즘의 영향으로 감소되기도 하는 것으로 관찰되었다.
- [0015] 따라서, 완전한 감소를 포함한 활성의 변화, 및 다양한 종류의 병원체에 대한 활성 범위의 제한은 BV-유형 및 AV-유형 감염의 경우 모두에 현재 적용되는 치료의 심각한 문제이다. 메트로니다졸에 대한 *가드넬렐라 바지날리스* 세균의 내성 발생 증가는 BV의 효과적인 치료 가능성을 제한하고, 아마도 임상 증상의 재발 빈도의 증가에 기여한다.
- [0016] 질 점막의 염증, 특히 혼합 특성 : BV + AV 또는 BV와 동반되는 이차 진균 감염의 염증 치료에서 중요한 역할은 천연 기원의 화합물에 의해 수행될 수 있다. 호기성 세균 및 혐기성 세균 둘 다에 대한 광범위한 항균 활성은 내성 케이스 또는 혼합 감염의 치료에서 치료 유용성을 결정하는 필수 조건이다. 또한, 자연 질 세균 미생물군의 생리학적 성분, 즉 *락토바실러스* 속의 유산균에 대한 새로운 물질의 영향도 고려해야 한다.
- [0017] 화학식 1에 나타난 화학 구조를 갖는, 일반명이 "토타롤"인 트리사이클릭 디 테르펜의 항균 활성.

화학식 1



- [0018]
- [0019] 이는 뉴질랜드 영토에서 발생하는 풍토성 나무 종 포도카푸스 토타라(*Podocarpus totara* (tōtara))에서 발견되는 자연 기원의 화합물입니다.
- [0020] 토타롤의 항균 활성은 다수의 과학 문헌 및 특허 공보에 게시되어 있다. 문헌["Antibacterial activity of totarol and its potentiation" *Journal of Natural Products* Vol. 55, No. 10, pp. 1436-1440, October 1992] 은 그람 양성 세균: *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*), *브레비박테리움 암모니아게네스* (*Brevibacterium ammoniagenes*), *스트렙토코커스 무탄스*(*Streptococcus mutans*), *프로피오니박테리움 아크네스* (*Propionibacterium acnes*) 및 *스타필로코커스 아우레우스*(*Staphylococcus aureus*)에 대한 토타롤-함유 추출물의 높은 효과성을 기술한다. 2003년 11월에 Mende-DEK Ltd.를 위해 준비된 "그람 음성 세균에 대한 항균제로서 토타롤 및 차나무 오일과 조합된 토타롤의 효능에 대한 임상 보고서"는 4 개의 그람 음성 세균: *살모넬라 멘스톤*(*Salmonella menston*), *대장균*(*Escherichia coli*), *엔테로박터 에로진스*(*Enterobacter aerogenes*), *녹농균* (*Pseudomonas aeruginosa*), 및 1개의 그람 양성 세균: *엔테로코커스 패칼리스*에 대한 토타롤의 효과성을 입증한다. 문헌["The synthesis and antibacterial activity of totarol derivatives. Part 1: modifications of ring-C and pro-drugs" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1999, 7(9):1953-1964]은 그람 양성 세균 폐렴 연쇄상구균(*Streptococcus pneumoniae*)에 대한 이의 활성을 기술한다. 상기 인용된 공보는 토타롤이 항균 활성을 갖고 있는 세균에 대한 정보를 포함할 뿐만 아니라 토타롤이 어떠한 항균 활성도 나타내지 않는 병원성 세균의 상당히 큰 그룹도 지시한다. 후자는 종종 같은 속의 병원체이며, 이에 대한 토타롤의 활성이 발견되어 각각의 미생물 균주에 미치는 영향의 불명확성과 개별성을 보여준다.
- [0021] 일본 특허 출원 JP 01311019의 명세서로부터, 외부 사용을 위한 제제에서 그람 양성 세균에 대한 토타롤의 활성

이 개시된다. 차례로, 특허 출원 W02005073154의 명세서는 식물 재료로부터 토타롤 추출 방법 및 이 추출에 따른 방법에 의해 수득된 토타롤로부터 제조된 제제를 제시한다. 이러한 명세서에서, 토타롤은 그람 음성 세균에 대해서도 작용한다는 것이 입증되었다. 제제의 조성, 이의 형태 및 용도는 이의 특정 목적을 지시하지 않으면서 매우 일반적인 방식으로 상기 출원에 개시되었다. 특허 출원 제W02014137231호의 명세서는 유선의 염증, 자궁염 및 상처의 치료를 위한 토타롤-함유 제제의 용도를 개시하고 있다. 특허 출원 제CN104027260호의 명세서는 구강 내 상처 치료를 위한 치약 또는 구강 세정액 형태의 제제의 용도를 개시하고 있다.

[0022] 지금까지, 질 점막 감염의 주요 원인이 되는 병원성 세균에 대한 토타롤의 항균 활성은 입증되지 않았다. 상기 세균은 BV 감염을 담당하는 그람-가변적 혐기성 세균 *가드네렐라 바지날리스* 및 AV 유형의 감염을 일으키는 그람-양성 호기성 세균 *스트렙토코커스 아갈락티애*이다.

[0023] 본 발명자들에 의해 수행된 인간 여성 산도로부터 단리된 임상 균주를 사용한 연구의 결과, 토타롤은 매우 낮은 MIC 농도에서 상기 언급된 병원체에 대해 매우 높은 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 병원성 혐기성 세균인 *가드네렐라 바지날리스*의 임상 균주 및 호기성 세균인 *스트렙토코커스 아갈락티애*의 임상 균주 둘 다에 대한 활성은 토타롤의 활성 스펙트럼이 메트로니다졸의 활성 스펙트럼과 겹치게 하는데, 메트로니다졸의 경우 상기 언급된 미생물의 내성이 크게 증가하여 효과적인 의학적 사용을 제한하거나 심지어 방해하므로, 이러한 활성은 매우 귀중하다.

[0024] 지금까지, *락토바실러스* 속의 유산균에 대한 토타롤의 영향은 알려지지 않았다. 이러한 연구는 본 발명자들에 의해 처음으로 수행되었다. 대표적인 혐기성 세균인 *가드네렐라 바지날리스*와 같은 *락토바실러스* 속 간균이 있다는 사실에도 불구하고, 이들 미생물에 대한 MIC 농도의 값에서 유의미하고 대략 10배의 차이가 있다는 것이 전혀 예기치 못하게 밝혀졌으며, 이는 하기 표 7에 가장 잘 설명되어 있다.

표 7

균주명	<i>E. 패칼리스</i>	<i>S. 아갈락티애</i>	<i>G. 바지날리스</i>	<i>L. 플란타룸</i>	<i>L. 가세리</i>
MIC 값	0.0025%	0.0013%	0.005%	0.08%	0.04%

[0026] 설명된 용도에서 토타롤의 독특성과 예외적인 품질을 결정하는 것은 동일한 속의 개별 세균에 대한 유효 농도 사이의 차이인 것은 명백하고, 동시에 이는 본 발명의 주제에 중요하다.

발명의 내용

[0027] 본 발명자들에 의해 처음으로 발견된 토타롤의 새롭고 독특한 특성은 본 출원의 주제가 되는 사용 중인 거대한 의학적 잠재력을 결정한다. BV 및 AV 모두의 주요 원인인 세균에 대한 높은 항균 효과성을 갖는 동시에 낮은 MIC 농도는 생리학적으로 올바른 질내 세균성 미생물군의 주요 성분인 *락토바실러스* 속의 공동 혐기성 간균에 대한 활성을 나타내지 않으므로 이에 대한 부정적인 영향도 미치지 않는다. 토타롤 작용의 이러한 독특한 메커니즘은 세균 기원의 질 감염의 치료에 있어서의 이의 막대한 치료적 유용성을 결정한다. 해당 MIC 범위에서 유산균에 대한 활성의 결여는 질 미생물군의 추가 멸균을 방지하는 동시에 이들 세균의 성장을 위한 최적의 조건을 생성한다. 유산균의 농도가 증가하면 질 보호 장벽이 자연적으로 회복되어 임상 증상의 재발을 예방하고 2차 진균 감염으로부터 질 환경을 보호하는데, 이는 클린다마이신을 사용한 고전적인 치료법을 수반한다.

[0028] 토타롤의 전술한 새롭고 예상치 못한 특성과는 별도로, 메트로니다졸의 경우에 발생하는 내성 메커니즘의 결여에 의해 거대한 치료적 잠재력이 결정된다.

[0029] 부인과 용도에서의 높은 치료적 유용성 및 안전성은, A-431 세포주를 사용하여 처음으로 수행된 인간 질 상피 세포에 대한 토타롤의 영향을 평가하는 조직 연구에 의해, 본 발명자들이 추가로 확인하였다. 수행된 시험은 광범위한 배양 시간(2-24 시간) 내에서 인간 질 상피 A-431 세포에 대한 시험 물질의 세포사멸 및 괴사 작용을 입증하지 않았다.

[0030] 특정한 엄격하게 한정된 MIC 농도의 토타롤에 대한 광범위한 항균 활성 범위를 확인하고 이와 동시에 *락토바실러스* 속의 유산균에 대한 활성의 결여 및 인간 질 상피 세포에 대한 부정적인 영향의 결여를 확인하는, 본 발명자들에 의해 처음으로 수득된, 시험 결과는 본 발명에 따른 토타롤의 용도에 대한 근거가 되었다. 본 발명에 따른 용도는 본 발명자들에 의해 수행된 연구의 결과이며, 이는 토타롤이 인간 여성 산도로부터 단리된 *가드네렐라 바지날리스* 및 *스트렙토코커스 아갈 락티애*의 임상 균주에 대한 활성이 있음을 지시한다. 본 연구는 문헌

[“Determination of the Minimum Concentration of Totarol & Antibiotics Required to Inhibit and Kill Growth of *Staphylococcus aureus* in Broth Cultures” (Project NZC-MEND-1312)]에 기술된 방법론을 토대로 하여 수행되었다. 기술된 연구를 수행하기 위한 결과 및 방법은 본 발명의 실시예에 상세히 제시되어 있다.

[0031] 그러나, 토타롤에는 물질의 물리-화학적 특성으로 인한 한계가 있다. 물에 완전히 용해되지 않는 분자의 소수성 특성은 부인과 조성물에 물질의 효과적인 적용을 배제하는 근본적인 기술적 문제이다. 약제학적 조성물의 표적 적용 지점, 즉 질 점막 때문에, 토타롤을 용해시키는 대부분의 유기 용매의 사용은 불가능한 것으로 밝혀졌다. 에탄올과 같은 알코올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 다가 알코올에 속하는 용매는 강한 자극 작용을 나타내며, 여기에 물을 첨가하면 용해된 토타롤이 침전된다. 염화메틸렌 또는 클로로포름과 같은 할로젠 유도체 용매의 사용 또한 이들의 독성 특성 때문에 불가능하다. N,N-디메틸포름아미드의 배아독성 및 기형발생 특성은 약제학적 조성물의 성분으로서의 용도에 실격이다. 시험관 내 연구에 적용된 DMI는 제약 산업에서 사용되지만 스테로이드 연고와 같은 외용 의약품의 생산에만 사용된다.

[0032] 질 미생물군의 조성은 임신 또는 폐경기 동안 도움을 주도록 적용되는 항생제, 내분비적 또는 면역적 활성제의 영향으로 변할 수 있으므로, 특히 약리학적 BV 치료가 완료된 후 질 젤 형태의 락트산을 사용하도록 권장된다.

[0033] 폴란드 특허 명세서 제pl 166898호는 5 내지 25 중량부의 락트산 및 10 내지 20 중량부의 95% 에틸 알코올로 구성된 용액 형태의 락트산으로 메틸셀룰로스를 용 매화하는 것으로 이루어진 메틸셀룰로스-락트산 복합체의 제조 방법을 개시하고 있다. 상기 용액을 연속적으로 혼합하면서 75 내지 95 중량부의 메틸 셀룰로스 상에 분무한 다음, 생성물을 건조시켜 에틸 알코올을 제거한다. 수득된 분말을 펠릿화한다. 락트산은 메틸 셀룰로스에 결합하여 이원 복합체를 형성한다. 락트산으로 용매화된 메틸셀룰로스는 급속한 물 고정 특성을 갖고, 생리학적 조건 하에서 질에서 생성된 점액과 유사한 점도, 접착성 및 코팅 특성을 갖는 겔을 형성한다. pH 조절에 기초한 작용을 갖는 락트산만을 사용하는 조성물은 질 감염의 치료의 경우에는 불충분하며, 예방 목적으로만 사용하거나 건강한 여성의 산도의 양호한 위생을 유지하기 위해 사용될 수 있다.

[0034] 특허 명세서 제pl 194437호, 제pl 201868호 및 제pl 201869호로부터, 메틸셀룰로스-락트산 복합체의 제조방법 및 이를 사용하는 조성물이 공지되어 있으며, 여기서 락트산 세균: *락토바실러스 크리스파투스(Lactobacillus crispatus)*, *락토바실러스 젠сени(Lactobacillus jenseni)*, *락토바실러스 람노수스(Lactobacillus rhamnosus)*, *락토바실러스 가세리(Lactobacillus gasseri)*, *락토바실러스 헬베티쿠스(Lactobacillus helveticus)*의 단일 균주가 동결 건조물의 형태로 활성 물질로서 추가로 사용된다. 상기 조성물은 75 내지 95 중량부의 메틸셀룰로스, 0.5 내지 5 중량부의 락트산, 0.5 내지 5 중량부의 염기성 중합체, 바람직하게는 유드라지트(Eudragit) 또는 키토산, 또는 폴리비닐피롤리돈 또는 이들의 혼합물, 및 0.5 내지 5 중량부의 *락토바실러스* 세균 동결건조물을 포함하며, 여기서 락트산 대 염기성 중합체의 화학량론 비는 1:1 내지 8:1의 범위 내이다. 상기 조성물은 배양 배지를 단당류 또는 다당류의 형태로 5 내지 10 중량부의 양으로 포함하는 것이 바람직하다. 이러한 공지된 조성물의 제조방법은 염기성 중합체 중의 유리 아민기에 대한 화학량론 비가 1:1 내지 8:1의 범위 내인 락트산 용액에 염기성 중합체를 용해시키고, 염기성 용액이 완전히 용해되도록 혼합한 후, 에틸 알코올을 5 중량부 이상의 양으로 첨가하여 완전한 균질해지도록 혼합하고, 이렇게 제조된 혼합물을 메틸셀룰로스 상에 분무하고 균일한 습윤이 달성될 때까지 혼합함으로써 이원 성분을 제조하는 것으로 이루어진다. 수득된 생성물을 건조시키면, 그 동안 에틸 알코올이 증발하고, 이렇게 수득된 건조 분말에 *락토바실러스* 세균 동결건조물을 첨가한다.

[0035] 상기 언급된 단일 균주의 질 투여의 목표는 생리학적 질 세균군의 완전한 회복을 위한 최적의 조건을 제공하는 것이다. 동시에, 상기 언급된 특허 명세서의 저자는 다른 인간의 해부학적 영역과 마찬가지로 생식 기관은 수많은 »생태적 틈새(ecological niche)»를 가지고 있으며, 결과적으로 질 원개, 자궁경부 채널, 자궁경부 외벽 및 질의 정면 부분이 모두 다른 세균군을 가지고 있음을 강조한다. 세균군의 구성에 있어서 상술한 차이는 *락토바실러스* 속의 균주의 단일 균주를 함유하는 상술한 조성물의 효과성을 감소시킨다. 단일 조성물에 더 많은 수의 균주를 사용하는 것은 현재의 연구에 비추어 볼 때 바람직하지 않은데, 그 이유는 이 경우 너무 높은 농도로 이들 세균을 유발하여, 결과적으로 세포용해성 질염의 원인이 되기 때문에 종종 질 칸디다증으로 오진되어 치료되기 때문이다.

[0036] 세균 동결건조물 형태의 원료는 살아있는 유기체를 함유한 물질의 특이성으로 인해 수많은 심각한 한계를 가지고 있으며, 기술적 조건 하에서의 이의 적용은 일련의 어려움과 관련이 있다. 프로바이오틱 원료의 파라미터는 발효 공정의 실현의 수많은 파라미터에 엄격하게 의존하는 높은 가변성을 특징으로 한다. 고순도의 최종 원료를 수득하기 위해서는 미생물의 생존력을 증가시키고 발효 과정을 안정화시키는 물질의 사용이 요구될 뿐만 아

나라 복잡하고 값비싼 정제 및 동결 건조 방법도 요구된다. 수득된 원료의 벌크에서의 콜로니 형성 단위(CFU)의 수는 세균 균주의 종류와 전체 생산 공정 실현의 방법 및 파라미터 모두에 엄격하게 의존한다. 상기 수치는 시간이 지남에 따라 지속적으로 감소하는데, 그 이유는 프로바이오틱 균주의 안정성과 생존력이 온도, 저장 조건 및 이들이 함유하는 물에 좌우되기 때문이다. 이는 프로바이오틱 제품의 저장 및 분배 동안 세균 특성의 생존력 및 안정성에 악영향을 미친다.

[0037] 제약 산업에서 의무적인 품질 관리 시스템 및 GMP(Good Manufacturing Practice: 우수 의약품 제조 관리기준) 지침이 이러한 원료를 심각한 미생물 오염원으로 분류하기 때문에 프로바이오틱 원료를 함유한 기성 약제학적 제제의 생산 공정은 전용 기계를 사용하여 분리된 생산 라인에서 실현되어야 한다. 전용 제조 장비를 사용해야 할 필요성은 높은 정작 위험과 정기적으로 사용되는 세척 절차로 인해 적절한 온도 달성이 보증되지 않는다는 사실에서 비롯된다. 이는 제품과 접촉하는 개별 작업 요소를 분해하는 것을 포함하여, 고급의 값비싼 세정 및 살균 방법을 사용함으로써 달성될 수 있다. 세정 및 멸균 절차는 유효성과 반복성을 확인하고 세정 장비에 적용된 공격적인 세척 물질이 소량조차 없다는 것을 확인하는 복잡한 검증 과정을 거친다.

[0038] 본 발명의 목적은 상기 정의된 문제들을 해결하는 것이다.

[0039] 본 발명의 요지는 세균 기원의 질 점막 염증을 치료하고 이러한 치료에서 증상을 완화시키기 위한 제제를 제조하기 위한 토타롤의 용도로 구성된다. 특히, 본 발명에 따른 용도는 세균성 질염(BV) 및 호기성 질염(AV)에 관한 것이다.

[0040] 바람직하게는, 본 발명에 따른 용도에서 토타롤은 75 내지 95 중량부의 셀룰로스 유도체, 바람직하게는 메틸셀룰로스, 0.5 내지 5 중량부의 락트산, 0.5 내지 5 중량부의 염기성 중합체, 바람직하게는 아크릴 중합체, 가장 바람직하게는 메타크릴산과 에틸 아크릴레이트의 공중합체, 또는 키토산 또는 폴리비닐피롤리돈 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물의 형태로 사용되며, 여기서 락트산 대 염기성 중합체의 화학량론 비는 1:1 내지 8:1의 범위 내이다. 본 발명에 따라, 조성물에서 활성 물질은 0.001 내지 5 중량부 함량의 토타롤이다.

[0041] 상기 조성물은 또한 프로바이오틱 세균용 배양 배지를 단당류 또는 다당류의 형태로 5 내지 10 중량부의 양으로 함유할 수 있다. 상기 조성물은 또한 성분 유형에 따라 0.001 내지 10 중량%의 양으로 추가의 활성 성분을 함유할 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 조성물은 토타롤이 알코올에 첨가되는 선행 기술(pl 194437, pl 201868, pl 201869)로부터 공지된 방법에 의해 제조된다. 보다 상세하게는, 염기성 중합체는 염기성 중합체 중의 유리 아민기에 대한 화학량론 비가 1:1 내지 8:1의 범위 내인 락트산 용액에 용해되고, 상기 용액을 혼합하여 염기성 중합체를 완전히 용해시킨 다음, 1차 알코올을 용해된 토타롤과 함께 5 중량부 이상의 양으로 첨가하여 완전히 균질해지도록 혼합하고, 이렇게 제조된 혼합물을 셀룰로스 유도체 입자의 표면에 적용하여 균일하게 흡윤되도록 혼합한다. 수득된 생성물을 건조시키고, 그 동안 1차 알코올을 제거한 다음, 생성물을 용기에 투입하거나 원하는 형태로 추가 가공한다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도면은 다음과 같다:

도 1 - 좌측으로부터 : H₂O₂를 사용한 8 시간 배양 후 피사 세포(배율 400x); 우측으로부터 : H₂O₂를 사용한 24 시간 배양 후 피사 세포(배율 400x).

도 2 - 좌측으로부터 : 배양 8 시간 후 상피 세포에서 세포사멸 및 피사 없음(배율 400x) - 음성 대조군; 우측으로부터 : 24 시간 배양 후 상피 세포에서 세포사멸 및 피사 없음(배율 400x) - 음성 대조군.

도 3 - 좌측으로부터 : 배양 8 시간 후 상피 세포에서 세포사멸 및 피사 없음(배율 400x)- 용매 대조군; 우측으로부터 : 24 시간 배양 후 상피 세포에서 세포사멸 및 피사 없음(배율 400x) - 용매 대조군.

도 4 - 좌측으로부터 : 배양 8 시간 후 상피 세포에서 세포사멸 및 피사 없음(배율 400x) - 토타롤; 우측으로부터 : 24 시간 배양 후 상피 세포에서 세포사멸 및 피사 없음(배율 400x) - 토타롤.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 본 발명에 따른 조성물은 질 점막의 염증을 예방 및 치료하는 데 사용하기 위한 것이다. 이는 엄격하게 한정된 양의 토타롤을 활성 물질로 적용하기 때문에 항균 활성의 높은 효과성과 선택성을 특징으로 한다. 추가로, 상

기 조성물은 항진균 및 항원생동물 활성을 나타내는 물질을 함유할 수 있다.

- [0045] 기술된 형태의 본 발명에 따른 조성물의 가장 중요하고 독특한 장점은, 병원성 세균에 대한 토타롤의 고도로 선택적인 항균 활성이 적절한 생물군집에 위배되지 않으며 생리학적 미생물군의 가장 중요한 성분인 *락토바실러스* 속의 유산균을 파괴하지 않는다는 사실이다. 올바른 질 미생물군의 성장과 회복을 자극하는 추가 약제는 락트산으로 구성되는데, 이는 pH를 낮추는 조절 기능으로 인해 산성 환경에 민감한 미생물에 대한 장벽을 형성하고 *락토바실러스* 속의 세균 성장에 유리한 조건을 생성한다.
- [0046] 현재 사용되는 해법에서, 항생제 형태의 치료 물질은 병원성 미생물군을 파괴하는 동시에 생리학적 미생물군 및 이의 주요 성분인 유산균을 파괴한다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 실험적으로 결정된 항균 활성 토타롤 농도의 존재로 인해 BV 및 AV로부터 야기되는 염증의 원인인 병원성 세균에만 특이적이고 선택적인 방식으로 작용한다. 이 농도는 본 발명자들에 의해 처음으로 수행된 연구 과정의 결과로서 결정되었다. 염기성 중합체로 완충된 조성물 중의 락트산의 추가 존재는 환경을 산성화하고 기존 *락토바실러스* 세균의 성장 및 발달을 지지한다. 이러한 사실로 인해, 상기 조성물은 매우 높은 효과성을 나타내는 동시에 생리학적 생물군집에 대한 악영향을 미치지 않으며, 이는 고전적 요법의 적용시 발생하는 BV 또는 AV 후 대다수의 환자에서 기록된 질병 재발을 제한한다. 동시에, 락트산 대 염기성 중합체의 비율 변화에 의한 정확한 pH 조절에 대한 공지된 가능성이 조성물에 이용될 수 있다. 상기 조성물은 점막의 전체 표면에 잘 부착되어 질 내부 체류 시간을 연장시키며 토타롤 형태의 항균제와 균일하게 접촉한다.
- [0047] 혼합 감염의 경우에 적용되는 조성물은 치료에 적합한 pH를 선택하면서 프로파일링된 항진균 또는 항기생충 활성을 갖는 물질로 조성물의 기본 구성을 보충함으로써 수득될 수 있다. 상기 조성물은 또한 예방 목적으로 또는 일상적 여성청결제로 사용될 수 있다. 루즈 파우더(loose powder) 형태의 조성물은 분진 분말로서 직접적인 부인과 치료를 위해 사용될 수 있거나, 적절하게 선택된 양의 정제수를 첨가한 후 젤 또는 질 용액과 같은 다른 형태의 제제를 제조하는데 사용될 수 있거나, 펠릿화 또는 페서리(pessary)를 가능하게 하는 공지된 물질과 혼합한 후 정제를 제조하는 데 사용될 수 있다. 언급된 모든 최종 제제의 목표 구성은 항진균 또는 항원생동물 활성을 나타내는 물질로 보충될 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 방법에 의해, 병원성 세균에 대해서만 지향하는 선택적 항균 활성을 갖는 조성물이 수득된다. 화학적으로 개질된 셀룰로스 유도체의 입자에 토타롤을 균일하게 적용함으로써 인해, 사용된 제제의 전체 부피에서 점막과 활성 물질의 접촉 표면이 전개되는 효과가 달성된다. 또한, 이 해법은 상당한 제한을 허용하며, 일부 경우 - 소수성 토타롤을 용해시키기 위해 최종 제품에 다량의 수-혼화성 유기 용매를 사용할 필요가 없어진다. 동시에, 사용된 염기성 중합체의 완충 효과의 결과로서, 질 pH를 조절하는 락트산과 함께 활성 물질의 점진적이고 연장된 방출의 효과가 달성된다. 상기 기술된 활성은 특허 명세서 제p1 166898호, 제p1 194437호, 제p1 201868호 및 제p1 201869호로부터 공지된 복합체를 사용하여 얻을 수 없었다. 본 발명에 따른 방법에 의해 제조된 조성물은 점막의 전체 표면에 대한 우수한 접착성을 제공하며, 이는 질 내부의 체류 시간을 연장시키고 토타롤 형태의 항균제와 균일한 접촉을 제공한다.
- [0049] 본 발명은 또한 질 점막의 세균 기원의 염증의 치료에서 지지적 치료 및 증상 완화를 위한 제제의 제조를 위한 상기 정의된 조성물의 용도를 포함한다. 상기 조성물은 질 점막의 감염이 재발하는 경우 특히 유용하다.
- [0050] 본 발명은 실시예에서 보다 상세하게 제시된다.
- [0051] 실시예 1.
- [0052] DMI(디메틸이소소르바이드)를 용매로서 사용하는 토타롤의 항균 활성 시험.
- [0053] 생리 식염수 중 0.5 McF의 현탁액(현탁액 밀도 10^8 cfu/ml)을 표준 균주의 24 시간 배양으로부터 제조하였다. 1 ml의 현탁액을 9 ml의 TSB 브로쓰에 수집하였다(희석 10^{-1}). 10^{-6} 희석된 현탁액을 설명된 방식으로 제조하였다. 추가 조사를 위해 세포 밀도가 10^5 cfu/ml인 현탁액을 선택하였다. 각각의 균주에 대해, 2개의 96-웰 플레이트를 제조하였다: 첫 번째 것은 OD 측정을 위한 것이고, 두 번째 것은 고체 배지에서의 정량적 배양을 위한 것이었다.
- [0054] A/ 웰 B1-D1, B2-D2 및 B-D 4-11에, 100 p1의 브로쓰를 첨가하고;
- [0055] B/ 웰 B3-D3에, 200 p1의 브로쓰를 첨가하고;

- [0056] C/ 웰 B1-D1에, 1 p1의 스탁 I를 첨가하고;
- [0057] D/ 웰 B2-D2에, 1 p1의 스탁 II를 첨가하고;
- [0058] E/ 웰 B3-D3에, 2 p1의 스탁 III를 첨가하였다.
- [0059] 다채널 피펫을 사용하여, 100 p1의 샘플을 각각의 B3-D3 웰로부터 수집하고 웰 B4-D4에 넣었다(5회 동안 내용물을 흡인하여 혼합하고 방치하기). 피펫 팁을 교체하고, 100 p1의 내용물을 B4-D4 웰로부터 수집하고, 이전과 같이 혼합하여 웰 B5-D5에 넣었다. 이러한 작업은 웰 B11-D11을 통해 반복되었다. B11-D11 웰의 내용물을 혼합하고, 100 p1의 유체를 수집하여 버렸다. 이러한 방식으로, 0.32 % 내지 0.0004 % 범위의 DMI에서 토타를 샘플의 일련의 희석물이 수득되었다. 이어서, 100 p1의 상응하는 세균 배양물을 웰 B, C, D 1-11에 첨가하였다. 결과적으로, 최종 농도 범위에서 0.16 % 내지 0.0002 %로의 변화가 발생하였다.
- [0060] 대조군 제조:
- [0061] 음성 대조군: 100 p1의 브로쓰 + 1 p1 DMI를 A1 웰에 첨가하였다.
- [0062] 양성 대조군(I): 세균 배양물을 갖는 100 p1의 브로쓰를 웰 E1-G1에 첨가하였다.
- [0063] 희석제 양성 대조군(II): 세균 배양물을 갖는 100 p1의 브로쓰 + 1 p1 DMI를 웰 E2-G2에 첨가하였다.
- [0064] 개별 웰의 OD 값을 620 nm의 파장에서 판독하였다(판독 시간 0). 두 번째 96-웰 플레이트로부터, 배양물을 적절한 고체 배지를 갖는 웰로의 모든 희석물로부터의 정량적 방법에 의해 접종하고, 균주에 따라 호기성 또는 혐기성 조건 하에서 37 °C에서 24 시간 동안 배양하였다. 플레이트를 37 °C의 배양기에서 호기성 조건 하에서 또는 CO₂ 농도가 높은 분위기에서(이를 필요로 하는 균주에 대해) 배양하였다. OD는 각각 8 시간, 16 시간 및 24 시간 후에 판독되었다. 모든 OD 측정 전에, 웰의 내용물을 섬세하게 혼합하였다. OD 판독과 병행하여, 모든 희석물로부터 두 번째 96-웰 플레이트로부터 배양물을 적절한 고체 배지를 갖는 플레이트 내로 접종하고, 호기성 또는 혐기성 조건 하에서 37 °C에서 24 시간 동안 배양하였다.
- [0065] 실험 결과의 분석을 위해, 개별 미생물(*가드넬라 바지날리스*, *스트렙토코커스 아갈락티에*, *엔테로코커스 패칼리스*, *락토바실러스 가세리/플란타룸*)에 대해 개별 시간(0, 8, 16, 24 시간)에서 3회 반복하여 얻은 OD 측정치의 평균값을 취하였다. 또한, 고체 배지에서 성장한 세균의 수를 고려하였다. 결과는 표 1, 2, 3, 4 및 5에 제시되어 있다. 상기 시험의 결과는 *락토바실러스* 속의 세균에게 안전한 낮은 MIC 값에서 병원성 미생물: *가드넬라 바지날리스*, *스트렙토코커스 아갈락티에*, *엔테로코커스 패칼리스*에 대한 토타를의 특정한 농도 의존적 선택성 및 높은 항균 효과를 확인한다.

표 1

엔테로코커스 패칼리스 - 임상 균주 (초기 작업 밀도 7.0×10^5 cfu/ml)								
토타론 농도	0 시간		8 시간		16 시간		24 시간	
	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균
스톡 I 0.16%	6×10^6	0.638	0	0.651	0	0.510	0	0.369
스톡 II 0.08%	3.2×10^6	0.448	0	0.539	0	0.499	0	0.491
스톡 III	0.04%	2.6×10^6	0.552	0	0.667	0	0.555	0
	0.02%	3.1×10^6	0.322	0	0.384	0	0.374	0
	0.01%	4.1×10^6	0.302	0	0.419	0	0.368	0
	0.005%	6×10^6	0.302	0	0.349	0	0.320	0
	0.0025%	5×10^6	0.284	0	0.297	0	0.295	0
	0.0013%	4×10^6	0.293	6×10^4	0.297	6×10^4	0.399	1×10^7
	0.0007%	2.5×10^7	0.288	3.1×10^5	0.291	3.8×10^5	0.445	2.1×10^7
0.0004%	3×10^7	0.298	2.1×10^5	0.303	1.1×10^6	0.491	1.9×10^7	
0.0002%	4×10^7	0.292	4.1×10^5	0.295	2.1×10^6	0.490	1.6×10^7	
제균 브로쓰 양성 대조군 (I)	7×10^6	0.238	6.2×10^6	0.381	6.2×10^6	0.531	3.1×10^7	0.659
제균 브로쓰 + DMI 양성 대조군 (II)	8×10^6	0.206	6×10^6	0.313	4.9×10^6	0.470	2.1×10^7	0.648
제균 브로쓰 + DMI 음성 대조군	0	0.248	0	0.249	0	0.240	0	0.238

[0066]

[0067]

엔테로코커스 패칼리스 균주에 대한 토타론의 MIC 값의 측정

표 2

스트렙토코커스 아갈락티에 - 임상 균주 (초기 현탁액 밀도 1.0×10^8 cfu/ml)								
토타론 농도	0 시간		8 시간		16 시간		24 시간	
	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD
스톡 I 0.16%	2×10^8	0.512	0	0.605	0	0.569	0	0.615
스톡 II 0.08%	5×10^7	0.563	0	0.564	0	0.540	0	0.430
스톡 III	0.04%	3×10^8	0.406	0	0.535	0	0.489	0
	0.02%	10^8	0.318	0	0.323	0	0.324	0
	0.01%	10^8	0.297	0	0.295	0	0.301	0
	0.005%	1.5×10^8	0.288	0	0.292	0	0.296	0
	0.0025%	2.6×10^8	0.289	0	0.290	0	0.291	0
	0.0013%	3.3×10^8	0.299	0	0.302	0	0.302	0
	0.0007%	4.5×10^8	0.297	6×10^4	0.319	3.5×10^6	0.630	6×10^7
	0.0004%	6×10^8	0.305	6×10^6	0.318	9.1×10^6	0.493	2×10^7
	0.0002%	3.4×10^8	0.289	4×10^6	0.314	1.1×10^6	0.498	1×10^7
	제균 브로쓰 양성 대조군 (I)	1.0×10^8	0.299	3×10^7	0.322	8×10^7	0.501	8×10^8
제균 브로쓰 + DMI 양성 대조군 (II)	3×10^8	0.277	8×10^7	0.299	6×10^7	0.501	6×10^8	
제균 브로쓰 + DMI 음성 대조군	0	0.333	0	0.344	0	0.330	0	

[0068]

[0069]

스트렙토코커스 아갈락티에 균주에 대한 토타론의 MIC 값의 측정

표 3

가드넬라 바지날리스 - 임상 균주
(초기 현탁액 밀도 2.8×10^8 cfu/ml)

토타롤 농도	0 시간		8 시간		16 시간		24 시간	
	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균
스톡 I 0.16%	1.4×10^8	0.822	0	0.564	0	0.451	0	0.438
스톡 II 0.08%	6.1×10^7	0.740	0	0.523	0	0.455	0	0.441
스톡 III 0.04%	3.7×10^7	0.460	0	0.416	0	0.411	0	0.379
	2.1×10^7	0.344	0	0.332	0	0.333	0	0.334
0.02%	1.6×10^7	0.319	0	0.323	0	0.325	0	0.328
0.01%	3.1×10^6	0.318	0	0.318	0	0.323	0	0.327
0.005%	1.3×10^6	0.312	5×10^4	0.311	5.2×10^4	0.314	2.3×10^4	0.317
0.0025%	1×10^6	0.321	2.7×10^4	0.314	6.2×10^5	0.318	1.2×10^5	0.322
0.0013%	9×10^4	0.315	6×10^4	0.307	2.1×10^7	0.326	3.8×10^5	0.346
0.0007%	2.2×10^5	0.326	2×10^5	0.334	4.9×10^5	0.362	3.9×10^5	0.390
0.0004%	1.5×10^5	0.313	2×10^5	0.328	2×10^5	0.364	2.2×10^5	0.398
제균 브로쓰 + DMI 양성 대조군 (I)	3×10^7	0.293	7×10^7	0.312	6.7×10^8	0.312	8×10^8	0.429
제균 브로쓰 + DMI 양성 대조군 (II)	3×10^7	0.321	6×10^7	0.336	7.3×10^8	0.336	1.1×10^9	0.516
제균 브로쓰 + DMI 음성 대조군	0	0.342	0	0.333	0	0.312	0	0.323

[0070]

[0071] 가드넬라 바지날리스 균주에 대한 토타롤의 MIC 값의 측정

표 4

락토바실러스 플란타룸 - 임상 균주
(초기 현탁액 밀도 1.9×10^8 cfu/ml)

토타롤 농도	0 시간		8 시간		16 시간		24 시간	
	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD, 3 회 측정치의 평균	검종 cfu/ml	OD
스톡 I 0.16%	3.7×10^8	0.472	4×10^8	0.320	7.1×10^8	0.346	4.1×10^8	0.371
스톡 II 0.08%	3.2×10^7	0.401	1.2×10^8	0.413	3.5×10^8	0.368	5×10^8	0.357
스톡 III 0.04%	2.6×10^7	0.398	1.6×10^8	0.370	2.4×10^8	0.379	2.4×10^8	0.397
	7.5×10^6	0.330	1.0×10^8	0.299	5.1×10^8	0.837	3.1×10^7	1.375
0.02%	5.5×10^6	0.295	5×10^7	0.298	6.4×10^8	0.871	3.4×10^7	1.445
0.01%	4.2×10^6	0.288	1.2×10^7	0.300	1.8×10^8	0.895	3.8×10^7	1.476
0.005%	2.8×10^6	0.284	1.0×10^7	0.303	8.4×10^8	0.914	1.4×10^7	1.552
0.0025%	3.8×10^5	0.293	3.2×10^5	0.305	5.1×10^8	0.913	4.1×10^7	1.521
0.0013%	6.5×10^5	0.292	4.5×10^5	0.300	8.1×10^8	0.902	5.1×10^7	1.504
0.0007%	2.1×10^5	0.304	2×10^5	0.309	3.9×10^8	0.892	3.1×10^7	1.508
0.0004%	3.9×10^5	0.291	3.5×10^5	0.305	4.2×10^8	0.854	2.9×10^7	1.469
0.0002%	1.9×10^5	0.324	6.1×10^5	0.317	6.2×10^8	0.939	3.2×10^7	1.560
제균 브로쓰 + DMI 양성 대조군 (I)	1.7×10^5	0.308	3.5×10^7	0.303	2.9×10^8	0.851	2×10^7	1.397
제균 브로쓰 + DMI 양성 대조군 (II)	1.7×10^5	0.308	3.5×10^7	0.303	2.9×10^8	0.851	2×10^7	1.397
제균 브로쓰 + DMI 음성 대조군	0	0.330	0	0.331	0	0.329	0	0.311

[0072]

[0073] 락토바실러스 플란타룸 균주에 대한 토타롤의 MIC 값의 측정

표 5

락토바실러스 가세리 - 임상 균주 (초기 현탁액 밀도 1.4 × 10 ⁸ cfu/ml)									
	0 시간			8 시간			16 시간		24 시간
	토타롤 농도	접종 cfu/ml	OD ₃ 회 측정치의 평균	접종 cfu/ml	OD ₃ 회 측정치의 평균	접종 cfu/ml	OD ₃ 회 측정치의 평균	접종 cfu/ml	OD
스톡 I	0.16%	6.5 × 10 ⁷	0.427	2.5 × 10 ⁸	0.411	3.1 × 10 ⁸	0.409	1 × 10 ⁸	0.406
스톡 II	0.08%	2.9 × 10 ⁷	0.526	1 × 10 ⁸	0.409	1.9 × 10 ⁸	0.463	1.2 × 10 ⁸	0.472
스톡 III	0.04%	4.6 × 10 ⁷	0.352	6 × 10 ⁸	0.335	4.5 × 10 ⁸	0.342	5 × 10 ⁸	0.349
세균 브로쓰	0.02%	1.4 × 10 ⁷	0.305	1.4 × 10 ⁸	0.299	2.1 × 10 ⁸	0.753	1 × 10 ⁸	1.208
	0.01%	3.9 × 10 ⁷	0.301	7 × 10 ⁸	0.297	5.3 × 10 ⁸	0.799	1.3 × 10 ⁸	1.301
	0.005%	1.2 × 10 ⁸	0.292	2 × 10 ⁸	0.300	9.1 × 10 ⁸	0.843	2.1 × 10 ⁸	1.387
	0.0025%	4.5 × 10 ⁷	0.285	1.5 × 10 ⁸	0.302	2.3 × 10 ⁸	0.880	2.3 × 10 ⁸	1.459
	0.0013%	3.8 × 10 ⁷	0.298	1.8 × 10 ⁸	0.301	4.1 × 10 ⁸	0.879	2.1 × 10 ⁸	1.457
	0.0007%	1.7 × 10 ⁸	0.289	1.9 × 10 ⁸	0.299	3.6 × 10 ⁸	0.879	3 × 10 ⁸	1.458
	0.0004%	5.1 × 10 ⁷	0.296	2.1 × 10 ⁸	0.306	3.9 × 10 ⁸	0.915	3.2 × 10 ⁸	1.484
	0.0002%	3.1 × 10 ⁷	0.299	2.1 × 10 ⁸	0.302	5.9 × 10 ⁸	0.897	2.9 × 10 ⁸	1.492
	양성 대조군 (I)	1.4 × 10 ⁷	0.293	4 × 10 ⁸	0.307	1 × 10 ⁸	0.885	1 × 10 ⁸	1.463
	양성 대조군 (II)	1 × 10 ⁸	0.297	1.4 × 10 ⁸	0.307	9 × 10 ⁸	0.776	9 × 10 ⁸	1.246
음성 대조군	0	0.330	0	0.331	0	0.329	0	0.311	

[0074]

[0075]

락토바실러스 가세리 균주에 대한 토타롤의 MIC 값의 측정

[0076]

실시예 2.

[0077]

A-431 세포주(ATCC® CRL-1555™)의 인간 질 상피 세포에 미치는 토타롤의 영향에 대한 시험.

[0078]

Annexin-V-Fluos(독일 만하임 로슈) 시험을 사용하여, 시험 제조사의 지시에 따라 시험관 내 조건 하에서 2, 8 및 24 시간 동안 배양하는 동안 연구를 수행하였다. 토타롤 샘플은 3 ml의 100 % DMI 중에 3 mg의 토타롤을 용해시켜 제조하였다.

[0079]

A-431 세포주의 배양 시간은 20일이었다. 배양은 10 %의 태아 소 혈청(FBS, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 DMEM 배양 배지(면역학 및 실험 요법 연구소 PAS [IITD PAN], 폴란드 브로츠와프 소재) 상에서 10 % CO₂를 함유하는 분위기에서 37 °C의 온도에서 수행하였다. 배양액은 48 시간마다 정기적으로 교체되었다. 디캔팅 가능한 성장 또는 소위 "단일층"을 달성한 후, 세포를 0.25 % 트립신(Sigma-Aldrich)을 사용하여 (약 10분 동안) 계대 배양 하였다. 이어서, 수득된 조직 세포주를 24-웰 플레이트(TPP)로 통과시켜 밀도를 웰당 5 × 10⁵의 값으로 조정 하였다. 연구된 세포주의 조직 배양은 현미경 슬라이드의 표면 상에 디캔팅 가능한 성장이 얻어질 때까지 24-웰 플레이트의 바닥에 위치한 멸균 현미경 슬라이드의 표면 상에서 다음 3 일 동안 수행되었다. 소위 "단일층"을 얻은 후, 세포를 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 이온이 없는 PBS(IITD PAN, 폴란드 브로츠와프 소재)로 세척하고, 10 % FBS가 포함된 700 µl의 새로운 DMEM 배지와 300 µl의 적절하게 제조된 토타롤과 함께 부었다.

[0080]

음성 대조군: 10% FBS를 갖는 1000 µl의 새로운 DMEM 배지.

[0081]

용매 대조군: 10% FBS를 갖는 700 µl의 새로운 DMEM 배지 + 300 µl의 DMI 용매.

[0082]

괴사 양성 대조군: 10% FBS를 갖는 900 µl의 새로운 DMEM 배지 + 100 µl의 H₂O₂(30%).

[0083]

Annexin-V-Fluos 시험을 사용한 적절한 검사는 세포사멸 세포의 녹색 착색을 유발한다. 괴사 세포의 착색에는 프로피디움 요오다이드(PI)가 사용된다. 이 염료는 손상된 세포막을 통해서만 세포 내부에 자유롭게 침투하여 내부를 적색으로 착색시키는 능력을 갖는다. 세포막의 손상이 없는 경우, 프로피디움 요오다이드는 그 표면에 남아 세포 주위에 특징적인 적색 "후광(halo)"을 형성한다. 상응하는 연구 시간, 즉 2, 8 및 24 시간 후, 배양 액을 제거하고, 내용물을 PBS(37 °C의 온도로 예열)로 2회 세척하였다. 이어서, Annexin-V-Fluos(Roche) 키트를 포함하는 100 µl의 형광성 착색제 혼합물을 각 현미경 슬라이드의 표면에 적용하고(배양 웰에 배치), 추가로 Hoechst 착색제를 사용하였다(세포 DNA 착색). 착색 절차는 제조사의 권장 사항에 따라 수행되었다. 배양물은

그 위에 도포된 착색제와 함께 실온에서 20 분 동안 배양하였다. 개별 착색제로 착색된 세포에 의해 방출된 빛의 강도는 400x 배율을 사용하여 494-520 nm의 파장에서 형광 현미경을 사용하여 관찰되었다. 5 개의 시야에서 세포를 계수하고 결과를 평균 내었다. 수행된 시험의 신뢰도는 양성 대조군으로 사용된 과산화수소에 의해 확인되며, 2 시간의 배양 후 이미 뚜렷한 괴사 과정을 일으킨다. 개별 시간(2, 8 및 24 시간)에서 5 개의 시야로부터의 평균 세포 수에 기초하여 데이터 분석을 수행하였다. 결과는 표 6과 사진 문서 - 도 1, 도 2, 도 3, 도 4의 형태로 제시되어 있다. 시험 결과는 광범위한 배양 시간(2-24 시간) 내에 인간 질 상피 A-431 세포에 대해 토타롤이 세포사멸 및 괴사 관련하여 영향을 미치지 않음을 입증한다.

표 6

[0084]

시험된 샘플	인간 질 상피 세포주 A-431								
	2시간			8시간			24시간		
	생존 세포	세포사멸 세포	괴사 세포	생존 세포	세포사멸 세포	괴사 세포	생존 세포	세포사멸 세포	괴사 세포
토타롤	100	0	0	100	0	0	100	0	0
음성 대조군	100	0	0	100	0	0	99	0	1
용매 대조군	100	0	0	99	0	1	97	0	3
괴사 양성 대조군	0	0	100	0	0	100	0	0	100

[0085]

인간 질 상피 세포 A-431의 세포사멸 및 괴사 현상에 대한 시험 물질-토타롤-의 영향

[0086]

실시예 3. 분말 형태의 조성물의 제조.

[0087]

조성물 성분:

[0088]

1. 토타롤 0.1 중량부

[0089]

2. 락트산 1.0 중량부(2 물)

[0090]

3. 유드라지트 E-100 1.5 중량부(1 물)

[0091]

4. 메틸셀룰로스 97.4 중량부

[0092]

상기 조성물은 기계적 교반기가 장착된 혼합기에서 조성물 구성에 언급된 화학량론 비로 락트산 중에서 유드라지트를 용해시키고 20 분 동안 혼합한 후 전체 혼합물을 24 시간 동안 정치시킴으로써 제조된다. 이 후, 상기 수득된 성분을 성분 총량당 10 중량부의 알코올 및 0.1 중량부의 토타롤을 사용하여 95% 에틸 알코올 중에 용해시킨다. 성분들이 용해될 때까지 전체 혼합물을 혼합한 다음, 상기 수득된 용액을 노즐 분무기의 혼합기 내에 배치된 메틸 셀룰로스 상에 노즐을 통해 분무하고, 메틸 셀룰로스가 균일하게 습윤될 때까지 혼합하지만, 10 분 이상이어야 한다. 습식 생성물을 강제 공기 순환 및 용매 응축기가 있는 건조기에서 25 °C의 온도에서 건조시킨다. 건조하는 동안, 에틸 알코올이 제거된다. 루즈 파우더가 수득되며, 이를 혼합하여 완전히 균질화시키고 플라스틱 또는 유리 용기에 투입한다.

[0093]

실시예 4. 젤 형태의 조성물의 제조.

[0094]

조성물 성분:

[0095]

1. 토타롤 0.5 중량부

[0096]

2. 락트산 0.5 중량부(1 물)

[0097]

3. 키토산 0.83 중량부(1 물)

[0098]

4. 메틸셀룰로스 98.2 중량부

[0099]

5. 정제수 성분 총량당 25 중량부

[0100]

조성물은 실시예 3에서와 유사하게 제조되지만, 분말 형태의 수득된 건조 생성물에 물을 혼합하면서 가해서 균질한 혼합물을 수득한 후 혼합 없이 30분 동안 정치시킨다. 수득된 젤은 어플리케이터를 사용하여 플라스틱 용기 내로 투입한다.

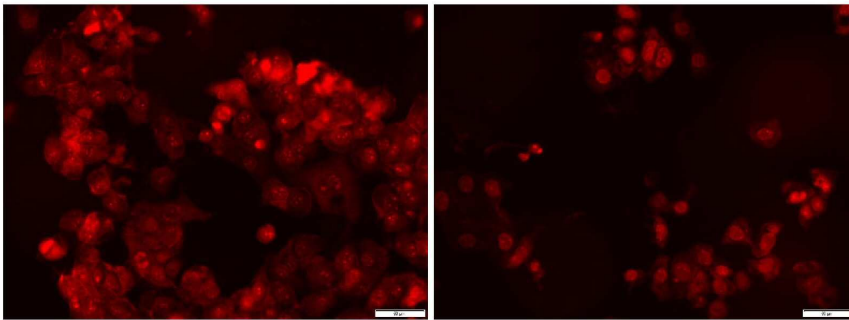
[0101]

실시예 5. 정제 형태의 조성물의 제조.

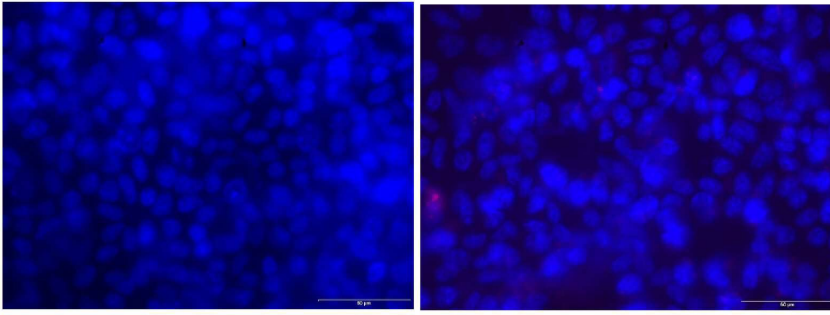
- [0102] 조성물 성분:
- [0103] 1. 토타롤 0.08 중량부
- [0104] 2. 락트산 0.5 중량부(1 몰)
- [0105] 3. 폴리비닐피롤리돈-90 1.5 중량부(1 몰)
- [0106] 4. 메틸셀룰로스 94.4 중량부
- [0107] 조성물은 실시예 3에서와 유사하게 제조되지만, 필요한 경우 분말 형태의 수득된 건조 생성물에 펠릿화에 사용되는 공지된 물질을 가한 다음, 생성물을 공지된 방법에 의해 적절한 치료 용량으로 펠릿화한다.
- [0108] 실시예 6. 성형된 페서리 형태의 조성물의 제조.
- [0109] 조성물 성분:
- [0110] 1. 토타롤 0.5 중량부
- [0111] 2. 락트산 4.0 중량부(8 몰)
- [0112] 3. 키토산 0.83 중량부(1 몰)
- [0113] 4. 메틸셀룰로스 94.4 중량부
- [0114] 조성물 성분 총량당 첨가제:
- [0115] 1. 젤라틴 16.5 중량부
- [0116] 2. 정제수 83.5 중량부
- [0117] 조성물은 실시예 3에서와 유사하게 제조되지만, 분말 형태의 수득된 건조 생성물을 물의 일부에 용해시켜 겔을 제공하고, 여기에 90 °C의 온도로 가열된 젤라틴 수용액(나머지 물로부터 제조됨)을 가하였다. 이어서, 생성물을 혼합하고 주형에 부어서, 성형된 페서리를 수득한다.

도면

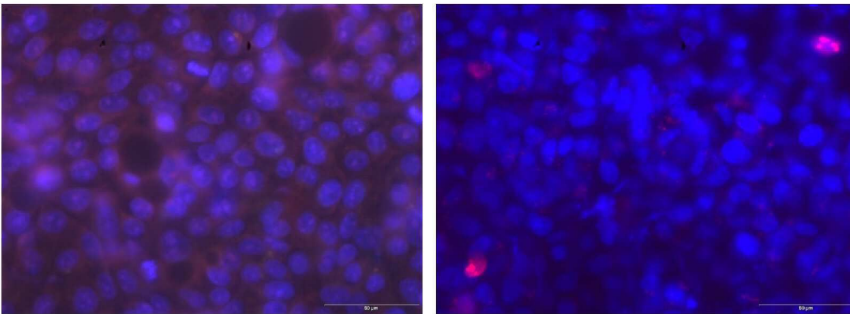
도면1



도면2



도면3



도면4

